

Cultivo de fibroblastos necesarios para la construcción del equivalente cutáneo.
Fotografía: Dirección de Comunicaciones.

Creando en un lab



Catalina Gaviria Agudelo

Bioingeniera, magíster en Ingeniería Biomédica, candidata a doctora en Ciencias Básicas Biomédicas.

Integrante del Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares —GITTC— de la Universidad de Antioquia y del grupo Laboratory of Genomic Instability in Development and Disease de la Universidad de Groningen.

Floris Fojjer

Biotecnólogo, doctor en Biología Molecular. Coordinador del grupo Laboratory of Genomic Instability in Development and Disease.

Luz Marina Restrepo Múnera

Bióloga, doctora en Ciencias. Profesora de la Facultad de Medicina y coordinadora del Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares —GITTC— de la Universidad de Antioquia.

Los sustitutos de piel son constructos hechos a partir de células humanas y pueden ayudar a estudiar la piel de las personas y a probar sustancias potencialmente dañinas, lo que hace que sean una poderosa alternativa al uso de animales de laboratorio.

do piel poratorio

Aunque parezca increíble, cada hora perdemos más de 1 millón de células muertas de la superficie de nuestra piel. Por eso, es necesario que constantemente nazcan nuevas células para reemplazar a aquellas perdidas y formar la capa más externa de la piel: la epidermis. Esta es la parte de la piel que se puede ver y está compuesta en su mayoría por células llamadas queratinocitos, que se dividen constantemente y cambian de función y forma mientras se dirigen a la superficie de la piel. Allí se quedan brevemente y luego comienzan a morir y a desprenderse, haciendo que todo el ciclo se repita.

Bajo la epidermis encontramos la capa de la piel más interna conocida como dermis. Se compone principalmente de células llamadas fibroblastos, los cuales se encargan de producir proteínas y otros componentes que forman la red donde residen las células, es decir, la matriz extracelular —MEC—.

Estas dos capas trabajan juntas para cubrir todo el cuerpo y protegernos contra agentes externos nocivos. Curiosamente, hasta hace poco se pensaba que la piel no tenía papel inmune y que era solo una envoltura que protegía los órganos del cuerpo. Sin embargo, ahora se sabe que participa activamente en el sistema inmune gracias a la presencia de las llamadas células dendríticas. Estas interactúan con agentes externos y pueden poner en marcha una respuesta inmune.

Productos de uso diario, como cremas, jabones o tratamientos para el cabello, pueden afectar la piel y producir sensibilización, es decir, una reacción de las células dendríticas en la piel que da lugar a una respuesta alérgica como resultado de exposiciones posteriores. Por tal motivo, es muy importante determinar el potencial de sensibilización de cualquier producto antes de que pueda ser comercializado.

Actualmente, la mayoría de las investigaciones para evaluar el riesgo de una sustancia se llevan a cabo en animales. Sin embargo, dados los cuestionamientos éticos que suscita el uso de los animales de experimentación y el hecho de que la piel animal no es una fiel representación de la piel humana, en los últimos años se han venido desarrollando métodos alternativos para estudiar la respuesta de la piel a estas sustancias potencialmente dañinas. Por esto, en el Grupo de Investigación Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares —GITTC— de la Universidad de Antioquia se ha venido trabajando en la generación de sustitutos de piel, que se componen de células cultivadas en el laboratorio y organizadas de tal forma que imitan la estructura y función de este órgano.

Elaboración de sustitutos cutáneos

En el GITTC realizamos un estudio en el que buscamos crear sustitutos de piel con un componente inmune para evaluar el potencial sensibilizante de sustancias químicas. El primer paso fue obtener las células. Para esto, partimos de sangre y de fragmentos de piel obtenidos de biopsias o cirugías reductoras. Gracias a tratamientos con enzimas, encargadas de romper las uniones entre célula y célula y entre las células y la MEC, pudimos obtener queratinocitos y fibroblastos de las biopsias. Por otro lado, dado que la sangre contiene muchos tipos distintos de células, utilizamos el método de gradiente de densidad para separar las diferentes



Proceso de construcción del equivalente cutáneo.
Fotografía: Dirección de Comunicaciones.

poblaciones celulares con base en su densidad. Así, en primer lugar, obtuvimos una mezcla de linfocitos y monocitos, que son células especiales del sistema inmune. Luego, aislamos los monocitos por medio de la separación magnética. En este caso, se utilizan esferas magnéticas que se adhieren específicamente a los monocitos que luego son aislados gracias a un imán.

Entonces procedimos con la construcción del sustituto de piel. Para esto, debíamos recrear tanto la dermis como la epidermis. Para la dermis elaboramos un gel de fibrina, donde incorporamos los fibroblastos. La fibrina es una proteína del plasma sanguíneo y participa en la formación de coágulos de sangre. En nuestro estudio tomamos plasma sanguíneo, incorporamos los fibroblastos e imitamos el proceso de coagulación gracias a la adición de calcio, obteniendo así un gel con fibroblastos embebidos y con características similares a las de los coágulos. Este se convirtió en nuestro sustituto dérmico.

Para la creación de la epidermis, utilizamos el gel de fibrina como soporte para sembrar en unos casos queratinocitos y en otros queratinocitos y monocitos. Estos cultivos fueron alimentados por 21 días, pues este es el tiempo en el cual los queratinocitos crecen y cambian de función, formando la epidermis.

El potencial de los monocitos en los sustitutos de piel

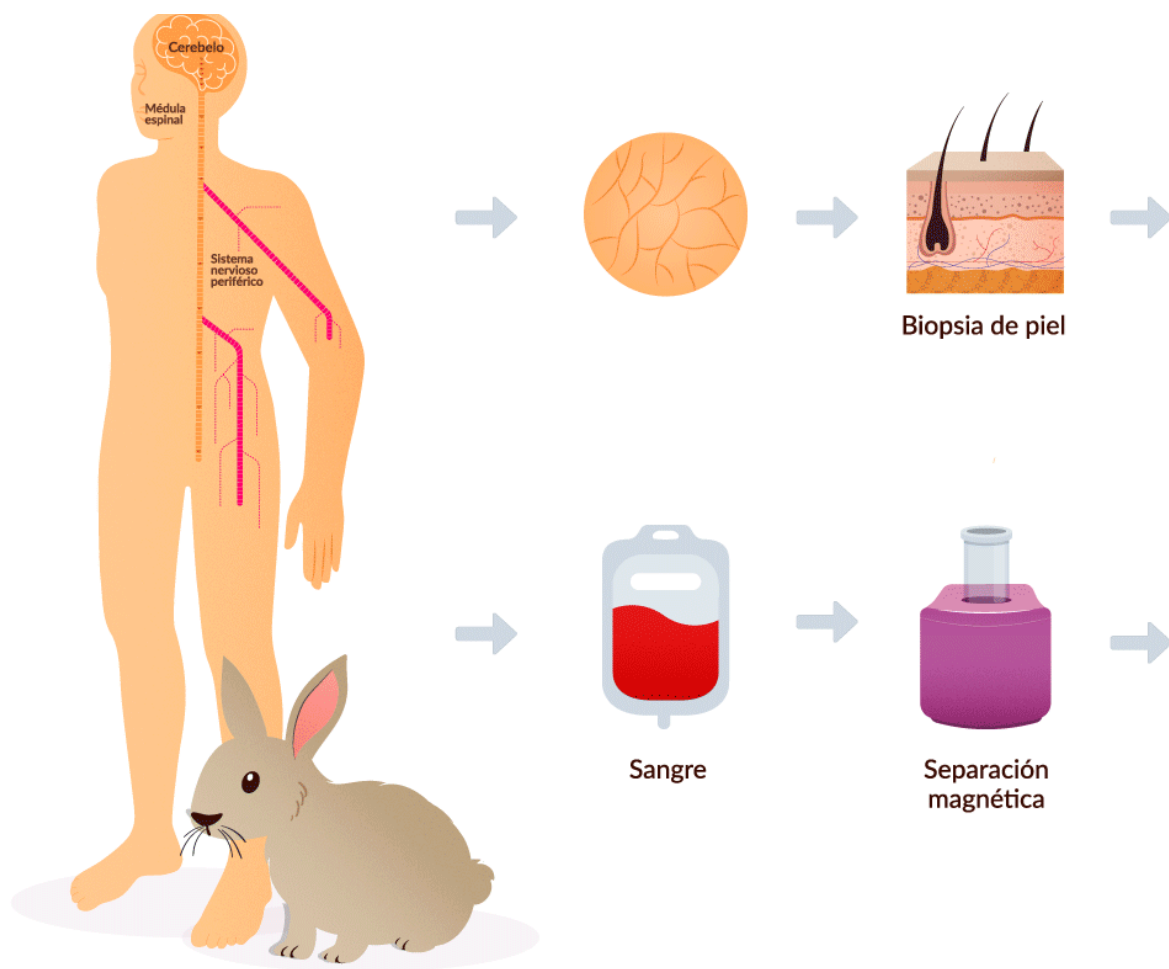
Luego de analizar los sustitutos de piel, comprobamos que el sustituto presentaba características físicas similares a las de la piel humana y que la presencia de queratinocitos y fibroblastos llevó a los monocitos a convertirse en células dendríticas, es

decir, células del sistema inmune encargadas de iniciar la respuesta de sensibilización. Como era de esperarse, estas no se encontraron en los cultivos generados solo con queratinocitos. Este resultado indicó que es posible utilizar monocitos para obtener sustitutos cutáneos para estudiar la inmunología de la piel.

Entonces evaluamos la capacidad de los sustitutos de piel para responder a sustancias sensibilizantes. Para esto aplicamos formaldehído y cloruro de manganeso, dos conocidos sensibilizantes. A la vez aplicamos solución salina como sustancia control, lo que nos permitió controlar que los efectos detectados no fueran resultado de otras condiciones de cultivo.

Cuando un sensibilizante entra en contacto con la piel, las células dendríticas se activan y migran hacia los nódulos linfáticos, pasando por la dermis. Por este motivo, decidimos analizar la localización de dichas células en nuestros sustitutos luego de la exposición a las sustancias de prueba. Observamos que para los sensibilizantes hubo una migración de células dendríticas, exhibiendo una localización diferente a la del control.



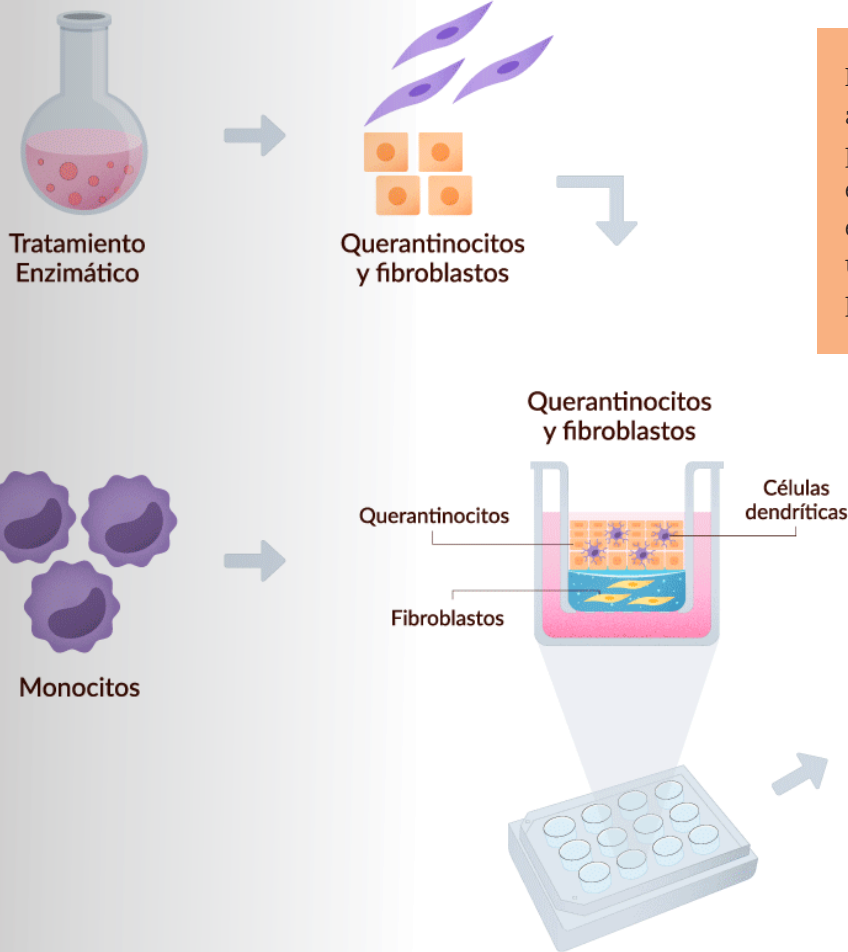


La promesa de los sustitutos de piel con células del sistema inmune

Los resultados de nuestro estudio indicaron que sustitutos de piel compuestos de queratinocitos y fibroblastos pueden promover la diferenciación de monocitos en células inmunes de la piel. Esto se debe probablemente a las moléculas y factores liberados por queratinocitos y fibroblastos que «ordenan» a los monocitos convertirse en células dendríticas, seguramente de diferentes tipos. Adicionalmente, estas células pudieron migrar a través del gel de fibrina como respuesta a la sensibilización, de manera similar a lo que sucede en la piel humana.

Hasta donde sabemos, esta metodología no había sido utilizada antes y representa un método más simple para obtener células dendríticas en sustitutos o equivalentes de piel. Adicionalmente, se destaca la posibilidad de obtener distintos tipos de células inmunes en un sustituto y a partir de un solo precursor como los monocitos, mejorando así los modelos de piel actuales.

Además del sistema inmune, los sustitutos de piel cuentan con numerosas aplicaciones en diferentes campos. Por ejemplo, además de sensibilizantes, se pueden utilizar también para evaluar sustancias irritantes o corrosivas, para modelar enfermedades como cáncer o psoriasis (y así desarrollar posibles tratamientos), para estudiar la pigmentación



Los sustitutos de piel son una innovadora alternativa para estudiar cómo reaccionaría la piel ante medicamentos o tratamientos. Con esto se podría reemplazar la experimentación en animales como conejos, ratones o cerdos, usados tradicionalmente en las etapas previas a la experimentación en humanos.

de la piel (adicionando otro tipo de células llamadas melanocitos) e incluso como injertos de piel para las personas que han sufrido quemaduras.

En la actualidad, los modelos de piel humana disponibles comercialmente tienen altos costos e involucran largos trámites de importación y legalización para poder ser utilizados en Colombia, y su transporte puede dar lugar a una posible pérdida de la calidad del producto. Adicionalmente, la mayoría se componen solo de queratinocitos, lo que excluye su uso en el campo de la inmunología. Es así como, con este proyecto, buscamos obtener un modelo local que permita el desarrollo y comercialización de productos en Colombia.

Glosario

Células dendríticas: tipo especial de célula inmunitaria que procesa antígenos (molécula que induce una respuesta inmunitaria) y los presenta a otras células del sistema inmune.

Enzima: proteína que acelera la velocidad de las reacciones químicas en los seres vivos.

Gradiente de densidad: fluido cuya densidad cambia y que se utiliza en la separación de diferentes tipos de células por centrifugación.

Plasma sanguíneo: porción líquida de la sangre.

Nódulos linfáticos: estructuras que filtran las sustancias conteniendo células del sistema inmune. **X**